

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1944

THÈSE

N°

34

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Valérien ILINE

Né le 31 décembre 1915, à Moscou (Russie)

Présentée et soutenue publiquement le 8 juin 1944

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DU
COMPLÉMENT ET DE SES FRACTIONS
(« COMPONENTS »)

Président : M. TROISIER, Professeur.

PARIS

IMPRIMERIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE

JOUBE & C^{ie}, ÉDITEURS

15, RUE RACINE, 15

1944

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Nom du Candidat : **ILINE.**

Prénom : **Valérien.**

Date de la soutenance :

Numéro d'ordre :

1

ILINE (Valérien). — Contribution à l'étude du complément et de ses fractions (« Components »). — Paris, Jouve et C^{ie}, édit., 1944, in-8°, 72 p.

(Th. Méd. (Et.), Paris, 1944,
N°.....)

2

ILINE (Valérien). — Contribution à l'étude du complément et de ses fractions (« Components »). — Paris, Jouve et C^{ie}, édit., 1944, in-8°, 72 p.

(Th. Méd. (Et.), Paris, 1944,
N°.....)

3

ILINE (Valérien). — Contribution à l'étude du complément et de ses fractions (« Components »). — Paris, Jouve et C^{ie}, édit., 1944, in-8°, 72 p.

(Th. Méd. (Et.), Paris, 1944,
N°.....)

4

ILINE (Valérien). — Contribution à l'étude du complément et de ses fractions (« Components »). — Paris, Jouve et C^{ie}, édit., 1944, in-8°, 72 p.

(Th. Méd. (Et.), Paris, 1944,
N°.....)

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1944

THÈSE

N° —

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Valérien ILINE

Né le 31 décembre 1915, à Moscou (Russie)

Présentée et soutenue publiquement le 8 juin 1944

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DU
COMPLÉMENT ET DE SES FRACTIONS
(« COMPONENTS »)

Président : M. TROISIER, Professeur.

PARIS

IMPRIMERIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE

JOUVE & C^{ie}, ÉDITEURS

15, RUE RACINE, 15

—
1944

I. — PROFESSEURS

MM.

Anatomie	ROUVIÈRE.
Physiologie	Léon BINET.
Physique médicale	STROHL.
Chimie médicale	POLONOVSKI.
Bactériologie	GASTINEL.
Parasitologie et histoire naturelle médicale	BRUMPT.
Pathologie et thérapeutique générales	BAUDOUIN.
Pathologie médicale	CHABROL.
Pathologie chirurgicale	PETIT-DUTAILLIS.
Anatomie pathologique	LEROUX.
Histologie	CHAMPY.
Pharmacologie et matière médicale	TIFFENEAU.
Thérapeutique	AUBERTIN.
Hygiène et médecine préventive	N...
Médecine légale	DUVOIR.
Histoire de la médecine et de la chirurgie	LIAN.
Pathologie expérimentale et comparée	Henri BENARD.
Hydrologie thérapeutique et climatologie	CHIRAY.
	ABRAMI.
	FIESSINGER.
	HARVIER.
	PASTEUR-VALLERY
	RADOT.
Hygiène et clinique de la première enfance	CATHALA.
Clinique des maladies des enfants	Robert DEBRÉ.
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale.	LÉVY-VALENSI.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	GOUGEROT.
Clinique des maladies du système nerveux	GUILLAIN.
Clinique des maladies infectieuses	LEMIERRE.
	CADENAT.
Clinique chirurgicale	BROCQ.
	QUÉNU.
	MONDOR.
Clinique ophtalmologique	VELTER.
Clinique urologique	CHEVASSU.
	N...
Clinique d'accouchements	N...
	PORTES.
Clinique gynécologique	MOCQUOT.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	LEVEUF.
Clinique thérapeutique médicale	LOEPER.
Clinique oto-rhino-laryngologique	LEMAITRE.
Clinique thérapeutique chirurgicale	SÉNEQUE.
Clinique propédeutique	M. VILLARET.
Clinique de la tuberculose	TROISIER.
Clinique chirurgicale orthopédique	MATHIEU.
Clinique de cardiologie	DONZELOT.
Clinique de neuro-chirurgie	Clovis VINCENT.
Assistance médico-sociale	N...
	DOGNON.
	GIROUD.
	HAZARD.
Professeurs sans chaire	JAYLE.
	JOANNON.
	OLIVIER.
	VERNE.

II. — AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM.

AMELINE Pathologie chirurgicale.
 BARIÉTY..... Pathologie médicale.
 BERNARD (Etienne.) Pathologie médicale.
 BESANÇON (Justin.) Hydrologie.
 BONNET Bactériologie.
 BOULIN..... Pathologie médicale.
 BROUET..... Pathologie médicale.
 BULLIARD.... Histologie.
 CACHERA..... Pathologie médicale.
 CORDIER..... Anatomie.
 COSTE..... Pathologie médicale.
 COUVELAIRE (Roger). Urologie.
 DELARUE Anatomie pathologique.
 DELAY Pathologie médicale.
 DEGREZ (H.)... Physique.
 DESOILLE..... Médecine légale.
 DIGONNET Obstétrique.
 DOGNON Physique.
 FEVRE Pathologie chirurgicale.
 FUNCK-BRENTANO. Pathologie chirurgicale.
 M^{lle} GAUTHIER-VILLARS. Anatomie pathologique.

MM.

GALLIARD Parasitologie.
 GARCIN Pathologie médicale.
 DE GENNES... Pathologie médicale.
 HAGUENAU... Pathologie médicale.
 LACOMME..... Obstétrique.
 LANTUÉJOL. Obstétrique.
 LAVIER Parasitologie.
 LELONG..... Pathologie médicale.
 LEMAIRE Pathologie expérimentale.
 LENÈGRE Pathologie médicale.
 M^{lle} J. LÉVY ... Pharmacologie.
 MARCHAL Pathologie médicale.
 MÉNÉGAUX... Pathologie chirurgicale.
 MOLLARET... Pathologie médicale.
 MOUQUIN..... Pathologie médicale.
 PATEL Pathologie chirurgicale.
 RENARD..... Ophtalmologie.
 RICHET..... Physiologie.
 SICARD Pathologie chirurgicale.
 SOULIE Pathologie médicale.
 SUREAU..... Obstétrique.
 TURPIN..... Pathologie médicale.
 WILMOTH Pathologie chirurgicale.

III. — AGRÉGÉS RAPPELÉS A L'EXERCICE

POUR LE SERVICE DES EXAMENS

MM.

ALGLAVE..... Pathologie chirurgicale.
 CHAILLEY-BERT Physiologie.
 GUÉNIOT..... Obstétrique.
 HEITZ-BOYER... Pathologie chirurgicale.
 HUGUENIN..... Anatomie pathologique.

MM.

LE LORIER..... Obstétrique.
 NEVEU-LEMAIRE. Parasitologie.
 PIÉDELIÈVRE... Médecine légale.
 VAUDESCAL.... Obstétrique.

IV. — AGRÉGÉS CHARGÉS DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE

A TITRE PERMANENT

MM.		MM.	
ALAJOUANINE...	} Clinique médicale.	BASSET	} Clinique chirurgicale
BRULÉ		GATELLIER...	
CHEVALLIER...		de GAUDART	
LAROCHE Guy...		d'ALLAINES	
MOREAU		MOULONGUET	
SÉZARY		MOURE	

MM.	
ÉCALLE.....	} Clinique obstétricale.
VIGNES.....	

V. — CHARGÉS DE COURS

MM.	
CHAILLEY-BERT, agrégé	Education physique.
LEDOUX-LEBARD	Radiologie clinique.
DECHAUME	Stomatologie.
N.	Puériculture.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A MON PÈRE

A MA MÈRE

In memoriam

A MES AMIS

A MES MAITRES
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR J. TROISIER

Professeur de la Clinique de Tuberculose
Membre de l'Académie de Médecine

*Qui nous a fait l'honneur d'accepter
la présidence de cette thèse. Qu'il veuille
trouver ici l'expression de notre respec-
tueuse reconnaissance.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR J. TRÉFOUEL

Directeur de l'Institut Pasteur
Membre de l'Académie de Médecine

Hommages très respectueux.

A MONSIEUR R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE

Secrétaire général de l'Institut Pasteur
Officier de la Légion d'Honneur

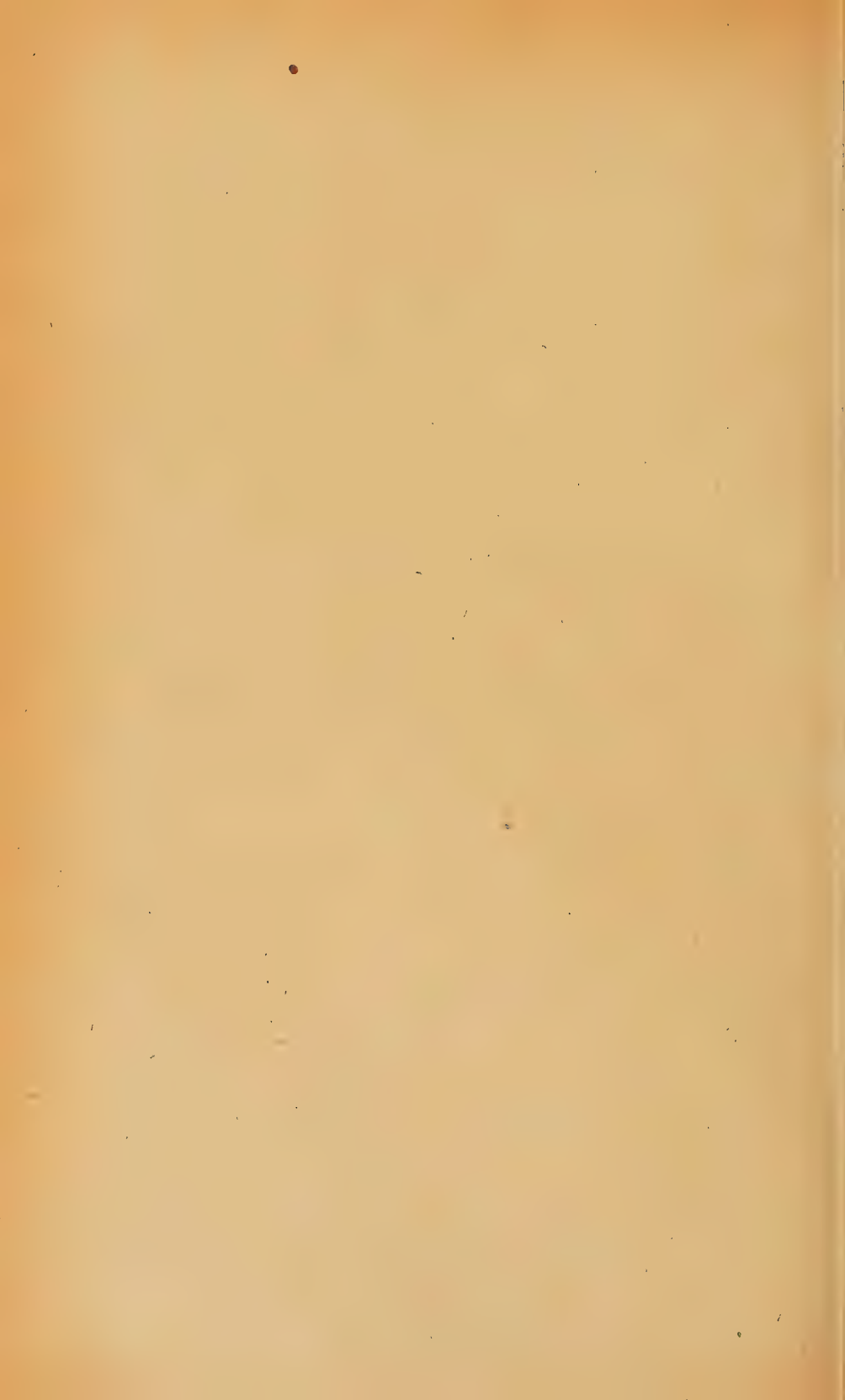
Avec mes plus vifs sentiments de reconnaissance.

A MON MAÎTRE

LE DOCTEUR N. KOSSOVITCH

Chef de Laboratoire à l'Institut Pasteur
Ancien Professeur à l'École d'Anthropologie de Paris

*Qui a inspiré et dirigé ce travail, qui
nous a guidé et encouragé dans nos
études, nous dédions cette thèse faible
témoignage de notre gratitude et de notre
affection.*



CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DU
COMPLÉMENT ET DE SES FRACTIONS
(« COMPONENTS »)

I

Introduction.

Il n'existe pas, en sérologie, de questions plus compliquées que celles du complément, c'est-à-dire de l'agent labile du sérum natif qui joue un rôle important, tant dans les phénomènes d'immunité, que dans une longue série d'immunoréactions : bactériolyse et hémolyse spécifiques, réaction de fixation et de déviation du complément, etc.

En effet, il n'est pas de sujet plus controversé, qu'il s'agisse de déterminer son origine physiologique dans l'organisme ou d'établir sa constitution physico-chimique.

En premier lieu, le complément existe-t-il dans le sang circulant ? D'après Fuchs et d'autres auteurs, il n'y aurait pas plus, dans les vaisseaux sanguins, de complément libre qu'il n'y a, par exemple, de prothrombine libre.

En second lieu, on est en droit de se demander si

la nature de ce complément répond simplement à un état physique du sérum, comme cela a été suggéré, ou bien plutôt à la constitution d'un complexe chimique hétérogène dont les diverses parties, ou « composants », peuvent être mises en évidence par leur action dans les phénomènes tels que bactériolyses, hémolyses spécifiques des globules rouges sensibilisés, nécessitant la mise en présence du complément et de l'ambocepteur.

Quel est d'ailleurs le mécanisme exact de la réaction du complément sur l'ambocepteur, quel est le processus intime qui régit cette liaison entre deux substances colloïdales ? Quelles sont les forces physico-chimiques en jeu, les affinités obscures entre ces deux complexes ? Toutes questions qui restent encore sans réponse.

Cependant de nombreux travaux avaient tenté d'éclaircir tous ces points : Bergonzini avait cru pouvoir établir que les particules lipidiques visibles à l'ultramicroscope servaient de support au complément, tandis que Dean mettait en évidence le pouvoir complémentaire dans un sérum privé de lipoïdes. En somme, de tous ces travaux, résultent deux tendances fondamentales : ou bien la « substance-complément » n'existe pas en tant qu'entité chimique et n'est que la manifestation d'un phénomène physique répondant à la faculté que possède le sérum de se fixer sur certains composés, ou bien ce complément à un substratum chimique très réel qui, dans certaines conditions physico-chimiques de milieu, d'amplitude

thermique, etc., se manifeste par sa réaction avec cette autre substance colloïdale qu'est l'ambocepteur. La question de la nature du complément est devenue encore plus complexe à partir du moment où l'on a pu dissocier celui-ci en plusieurs éléments « composants ».

Quant au mécanisme intime de son action sur l'ambocepteur, nous sommes placés entre deux hypothèses, lancées depuis longtemps, d'une part par Ehrlich et son école, d'après laquelle le complément se fixe sur les globules rouges sensibilisés comme un corps chimique, selon les lois des proportions définies, d'autre part par Bordet, selon laquelle l'action du complément est de nature physique et peut être comparée à l'adsorption du colorant par les fibres végétales après action d'un mordant (fibre + mordant + colorant = antigène + ambocepteur + complément).

Mais, si le fonctionnement intime de la fixation du complément à l'antigène par l'intermédiaire de l'ambocepteur pour la réalisation de la fonction bactériolytique ou hémolytique constitue encore un des grands problèmes de l'immunoséologie, nos connaissances sur la composition du complément ont fait des progrès notables. Une longue série de recherches ont permis de constater que le complément ne se présente pas comme une substance homogène, mais que « c'est un complexe des fonctions de divers facteurs biologiques » (Bordet).

II

Généralités. Historique.

Avant d'aborder le sujet même de notre travail, il y a lieu de passer en revue les étapes parcourues par la science sérologique, et surtout par la vaste branche que constituent la théorie et la pratique des immuno-réactions dans lesquelles le complément joue un rôle important, soit directement, soit indirectement.

En 1888, Nuttall, dans un travail magistral inspiré par le phénomène de la phagocytose de Metchnikoff, constata que le sérum sanguin possède un pouvoir bactéricide pour certains bacilles. Il effectua une longue série d'expériences sur l'homme et certains animaux à sang chaud (chien, lapin, cobaye, souris, etc.), et constata qu'à l'exception de la souris, tous ces animaux possèdent le pouvoir bactéricide. (L'absence de pouvoir chez la souris est due, d'après Ritz, à l'action de substances « anticomplémentaires » présentes dans le sang). Nuttall constata d'autre part que ce pouvoir est instable et disparaît après le chauffage du sérum 30 minutes à 56°, ou par vieillissement. De ce dernier fait, il conclut que le pouvoir bactéricide est dû à l'action d'un enzyme.

D'après Nuttall, la phagocytose se produit soit si les bacilles sont morts, soit s'ils sont suffisamment atténués par l'action du pouvoir bactéricide du plasma sanguin. Cette conclusion devait être la base des études de Wright qui, vingt ans plus tard, devaient aboutir à la découverte par ce savant des opsonines.

Un an après, Buchner confirmait les résultats obtenus par Nuttall et, en 1890, en dialysant des sérums sanguins, pouvait affirmer que le pouvoir bactéricide est un attribut d'une substance albuminoïde du sérum. En 1891, Buchner appelait cette substance « alexine ».

Fodor, Nuttall, Buchner, et une série d'autres auteurs ont prouvé que les humeurs de l'organisme, comme le sérum sanguin, contiennent des substances bactéricides. La présence de ces substances dans le sang et dans les humeurs organiques peut être prouvée par l'ensemencement de microbes sur des milieux contenant du sang total, du sang défibriné, du sérum sanguin, ou d'autres humeurs organiques.

En 1890, v. Behring et Kitasato montrèrent que le sérum d'un animal auquel on a fait des injections répétées de doses subléthales de toxine tétanique ou diphtérique acquiert la propriété de neutraliser ces toxines et inhibe ainsi leurs effets nocifs.

L'étude de l'alexine n'a pas marqué de progrès notables jusqu'en 1893, date à laquelle, à la suite de la découverte du phénomène de Pfeiffer, la question reçut une nouvelle impulsion.

Entre 1893 et 1895, Pfeiffer et Issaef étudièrent le phénomène de la bactériolyse, ou dégénérescence gra-

TABLEAU I.
Bactéricidie.

Milieu	Ensemencement	Nombre de colonies		
		Immédia- tement après l'ensemencement	Après 2 heures	Après 5 h. 1/2
Sang de chien (peptoné)	Bac. Eberth	1.233	129	0
		4.340	136	1
		4.510	168	2
Sang de lapin dé- fibriné	Bac. du Charbon (sans spores)	284	53	8
		512	21	8
		375	12	0
Sérum de lapin	Bac. du Charbon	3.326	3	0
	Bac. Eberth	1.162	29	0

In Buchner: l'action bactéricide du sang.

nulaire, suivie de dissolution, des vibrions cholériques et autres microbes introduits dans la cavité péritonéale du cobaye préalablement inoculé de cultures tuées des microbes à étudier. Ils confirmèrent que les substances qui déterminent la bactériolyse se trouvent dans le sang et dans les autres humeurs de l'organisme. Ils montrèrent que les sérums des animaux auxquels on a inoculé certaines substances étrangères (antigène), vivantes ou non, acquièrent la propriété spécifique d'entrer en réaction avec la substance introduite. Ces sérums sont appelés par Bordet « immunsérums » ou « antisérums ».

Etudiant les observations de Buchner, Bordet prouva d'une manière ingénieuse que l'action bactéricide du sérum est le résultat d'une activité simultanée de deux substances différentes : l'une spécifique,

relativement thermostable, et qu'il appelle « sensibilisatrice » ; l'autre non spécifique, thermolabile, correspondant à « l'alexine » de Buchner. La première de ces substances, si elle est présente dans le sérum normal, y est rarement trouvée en quantité notable ; elle augmente pendant l'immunisation et n'est pas détruite par chauffage à 56°. La seconde, normalement présente dans le sérum de la plupart des animaux, est inactivée par le chauffage à 56° pendant 30 minutes ; elle n'augmente pas pendant l'immunisation.

En même temps, Bordet prouvait que la propriété lytique de l'alexine n'est pas limitée aux êtres vivants (bactéries), mais qu'elle s'étend aussi aux éléments cellulaires des organismes supérieurs, comme les globules rouges. Il prouvait que l'hémolyse produite par le sérum obéit aux mêmes lois qui régissent la bactériolyse, et grâce à la simplification de sa technique, rendait possible l'étude de problèmes qui étaient avant ses découvertes presque insolubles.

Les explications théoriques des découvertes de Bordet ont soulevé des discussions entre Bordet et Ehrlich et entre leurs écoles, à propos du mécanisme intime de la fixation des deux substances qui interviennent dans les phénomènes de la bactériolyse et de l'hémolyse.

En 1896, Grubet et Durham publièrent leurs recherches sur l'agglutination des bactéries. Widal applique la technique de l'agglutination et réalisa grâce à cette méthode le diagnostic sérologique de la fièvre typhoïde.

En 1897, Krauss montra qu'un filtrat de culture de vibron cholérique donne une réaction de précipitation avec son propre immunsérum (antisérum homologue), alors qu'il n'en donne aucune avec le sérum anti-pestueux, par exemple, et *vice-versa*. Il montrait ainsi que cette réaction était spécifique.

En 1898, Bordet publia les résultats de ses études sur un phénomène immunologique d'une grande importance, tant théorique que pratique. Il montrait que, si on injecte à un animal les globules rouges d'un animal d'une espèce différente, on constate la formation dans le sérum du premier animal d'anticorps lytiques. Il montrait que la lyse des globules rouges, analogue à la lyse des bactéries, dépend de l'action simultanée de deux différentes substances : l'une thermostable, spécifique, la « sensibilisatrice » ou « ambocepteur » ; l'autre non spécifique, thermolabile, présente dans le sérum normal, l'« alexine » (Bordet) ou « complément » (Ehrlich). La substance spécifique (sensibilisatrice) se développe au cours de l'immunisation et en est le résultat.

Cette importante découverte a incité un grand nombre de chercheurs à étudier cette question, qui est devenue la base de toute la sérologie pratique.

Poursuivant ses études d'immunosérologie, Bordet publia, avec Gengou en 1901, les résultats de leurs recherches sur l'application pratique de la découverte de l'hémolyse spécifique. Ils précisèrent qu'on peut constater la fixation du complément par les bactéries qui ont adsorbé la sensibilisatrice spéci-

fique, soit par voie directe (bactériolyse), soit par voie indirecte (hémolyse de l'indicateur : globules rouges de mouton). Ils constatèrent que si l'on mélange un antigène (substance qui, introduite par voie parentérale dans un tissu animal, stimule la production d'anticorps et qui, mélangée avec cet anticorps provoque une immunoréaction) avec l'anticorps (sérum de l'animal immunisé correspondant, le complément (sérum de cobaye, par exemple) se fixe sur le complexe antigène-anticorps. Dans le cas où le complexe antigène-anticorps n'est pas homogène, c'est-à-dire si l'anticorps ne correspond pas à l'antigène, le complément ne se fixe pas sur le complexe et demeure libre.

Pour suivre la réaction, ils ont introduit un indicateur biologique, grâce auquel on peut décider si le complexe antigène anticorps à l'étude est homo ou hétérogène. L'indicateur biologique de Bordet-Gengou consiste en globules rouges de mouton sensibilisés, c'est-à-dire ayant adsorbé la sensibilisatrice spécifique. Cette sensibilisatrice est le sérum de lapin immunisé par des globules rouges de mouton ; elle doit être inactivée par chauffage, et permettra de savoir si le complément (sérum frais de cobaye) est libre ou adsorbé par le complexe antigène-anticorps.

Voici brièvement le schéma classique qui se trouve à la base de la plupart des réactions sérologiques :

Globules rouges de mouton (antigène) + sérum frais de lapin immunisé par des globules rouges de mouton (anticorps). Ce complexe antigène + anticorps

provoque l'hémolyse des globules rouges de mouton. Les deux substances nécessaires pour l'hémolyse sont présentes dans le sérum de lapin (sensibilisatrice spécifique et complément). Mais, si l'on chauffe le sérum de lapin à 56° pendant 30 minutes, on détruit la substance thermolabile (c'est-à-dire le complément), sans détruire la sensibilisatrice.

Le schéma est : globules rouges de mouton + sérum chauffé de lapin. Dans cette combinaison, on n'aura pas d'hémolyse, la substance nécessaire à l'hémolyse (complément) faisant défaut.

Si, à ce complexe (globules rouges + sensibilisatrice chauffée, on ajoute alors du complément (sérum frais de cobaye), on provoque l'hémolyse. Le schéma est le suivant :

Globules rouges de mouton (antigène) + sérum chauffé de lapin (sensibilisatrice, hémolysine ou anticorps) + sérum de cobaye (complément ou alexine).

Dans ce cas où l'antigène et l'anticorps forment un complexe homogène, puisque le lapin a été sensibilisé pour les globules rouges de mouton, le complément se fixe sur ce complexe. Le schéma suivant présente plus clairement la découverte de Bordet.

*Schéma des réactions fondamentales
pour la démonstration de la réaction lytique.*

Le sang de mouton, défibriné ou citraté, est centrifugé ; les globules rouges sont séparés et lavés deux ou trois fois à l'eau physiologique pour les

débarrasser du sérum. On fait une émulsion à 5% dans l'eau physiologique, on prépare les hémolysines (sensibilisatrices) spécifiques en immunisant un animal (dans la plupart des cas, c'est le lapin) au moyen de globules rouges de mouton, on chauffe le sérum à 56° pendant 30 minutes pour décomplémenter (inactiver). On emploie le sérum frais de cobaye comme complément.

- (1) Globules rouges + Sensibilisatrice chauffée..... → Ho
- (2) Globules rouges + Complément..... → Ho
- (3) Globules rouges + Sensibilisatrice chauff. + Complément..... → H+

Si on centrifuge (1) et (2), et si on examine séparément le liquide surnageant et le dépôt pour rechercher la présence de la sensibilisatrice et du complément, on obtient les résultats suivants :

- (4) Dépôt de (1) + Complément..... → H+
- (5) Liquide surnageant de (1) + Globules rouges + Complément..... → Ho
- (6) Dépôt de (2) + Sensibilisatrice..... → Ho
- (7) Liquide surnageant de (2) + Globules rouges + Sensibilisatrice..... → H+

Ce schéma est la base de toutes les réactions sérologiques connues sous le nom de « réactions de fixation et déviation du complément ». Grâce à cette ingénieuse découverte de Bordet, le diagnostic différentiel d'un grand nombre de maladies, surtout de maladies infectieuses, a fait un grand pas en avant en bénéficiant de la sûreté des réactions qui en ont dérivé et de la simplicité de leurs techniques.

Mais si l'application pratique de cette découverte a fait de grands progrès, le mécanisme intime de l'action des deux facteurs : facteur spécifique (anticorps, sensibilisatrice ou ambocepteur), et facteur non spécifique (alexine ou complément) sur les globules rouges dans le phénomène de l'hémolyse reste encore à étudier. La discussion à ce sujet entre les deux grands maîtres de l'immunologie, Ehrlich et Bordet, a été le point de départ de nombreuses recherches, mais la question, malgré toutes les études effectuées, reste toujours dans le domaine des hypothèses plus ou moins ingénieuses.

III

Constitution complexe du complément.

Nous donnerons dans ce chapitre la définition des cinq constituants du complément et leurs caractères généraux. La technique d'isolement de chacune des fractions fera l'objet du chapitre suivant.

Ainsi que nous l'avons déjà dit, si le fonctionnement intime du complément nous échappe encore, nos connaissances sur sa composition ont fait des progrès considérables. La possibilité de dissocier les fonctions du complément en plusieurs « composants » montre que le terme de « complément » n'est pas tout à fait correct. Il ne s'agit pas, comme nous le montrerons plus loin, d'une seule substance définie possédant la fonction complémentaire, mais plutôt d'un système exceptionnellement compliqué, dont l'ensemble des fonctions est bien l'action complémentaire spécifique, mais dont aucun des constituants ne peut être considéré à lui seul comme le complément. Une longue série de recherches a prouvé qu'il est possible, par des procédés spéciaux, de dissocier le complément en plusieurs fractions, que chacune de ces fractions isolée n'est pas active, mais que le

pouvoir complémentaire résulte de l'ensemble de leurs actions.

Ces diverses fractions sont désignées sous les noms C'_1 à C'_5 qui correspondent à l'ordre chronologique de leur découverte.

**A. — FRACTIONS THERMOLABILES
DU COMPLÈMENT
FRACTION GLOBULINIQUE C'_1
ET ALBUMINIQUE C'_2**

a) PARTIE THÉORIQUE.

En 1907, Ferrata, reprenant les travaux de Nuttall et de Buchner sur le pouvoir bactéricide du sang, découvrit que le complément est composé d'au moins deux fractions : l'une fixée sur la partie globulinique du sérum : « chaînon moyen », (« Mittelstück » des Allemands « midpiece » des Anglais, C'_1 des auteurs américains), peut être isolée du sérum frais par plusieurs procédés : dialyse, action de HCl faible, de CO_2 etc. ; l'autre, fixée sur la partie albuminique (1) est le « chaînon terminal », (« Endstück, « endpiece » ou C'_2) ». Ni l'une ni l'autre de ces deux fractions ne peut à elle seule déterminer l'hémolyse des globules

(1) Il est bien entendu, lorsqu'on parle de globuline et d'albumine, qu'on ne peut séparer rigoureusement ces deux fractions protéidiques. La partie globulinique contient des globulines et des euglobulines, la partie albuminique contient des albumines et des pseudoglobulines.

rouges sensibilisés, pour laquelle les deux fractions sont indispensables.

Ferrata a montré que, si on isole la partie globulinique du sérum frais par dialyse contre de l'eau privée d'électrolytes, le sérum ainsi privé de sa fraction albuminique perd son pouvoir complémentaire, mais que celui-ci n'est pourtant pas irrémédiablement détruit. D'autre part, si, par un procédé quelconque (V. plus loin la technique), on élimine les globulines labiles du sérum, on constate que la partie albuminique, contenant la deuxième fraction du complément (C'_2) ne possède pas non plus, à elle seule, de pouvoir hémolytique.

Cet intéressant résultat fut confirmé par de nombreuses recherches, et l'existence de deux fractions a été prouvée.

Brand, en 1907 également, montra, non seulement que les deux substances sont thermolabiles, mais que la portion globulinique, après dissolution dans l'eau physiologique, adhère directement aux globules rouges sensibilisés et que, sans cette adhésion fraction albuminique ne peut exercer aucune action hémolytique. Cette dernière partie du complément se comporte vis-à-vis de la première comme celle-ci se comporte vis-à-vis de la sensibilisatrice.

La globuline labile du complément (« chaînon moyen » ou C'_1) a la propriété de se fixer à la surface des molécules d'antigène et de renforcer ainsi la précipitation, l'hémoagglutination dans le complexe antigène-anticorps. Mais cependant, l'adsorption de

cette fraction par les globules rouges n'est pas suffisante pour l'hémolyse. Les globules rouges sont « persensibilisés » (Michaelis) et, pour obtenir l'hémolyse, il faut encore ajouter la partie albuminique. On pouvait supposer que cette dernière partie constituait le vrai principe lytique. Certains faits venaient à l'appui de cette hypothèse, car on obtient l'hémolyse par la combinaison du chaînon moyen du sérum de différents animaux avec le chaînon terminal du sérum de cobaye, mais jamais inversement. Cependant, étant donné que la partie albuminique ne peut pas, à elle seule, produire l'hémolyse, on est obligé d'admettre que la partie globulinique adsorbée place les globules rouges dans un état qui facilite l'hémolyse. Par conséquent, le mécanisme de l'hémolyse se présenterait ainsi : globules rouges + immunoglobuline (sensibilisatrice) + globuline non spécifique (fraction C'_1 du complément) + albumine (fraction C'_2 du complément) = hémolyse.

Le mécanisme de l'adsorption est très compliqué. L'immunoglobuline adsorbée à la surface des globules rouges ou des micelles d'antigène est dénaturée et crée ainsi un complexe pouvant adsorber une certaine quantité de globuline non spécifique. Il existe une différence entre l'adsorption par l'antigène de l'immunoglobuline (sensibilisatrice) et de la globuline non spécifique (complément) : l'immunoglobuline est fixée irréversiblement, tandis que la fixation de la globuline non spécifique est réversible ; la première est transformée et fixée sur l'anti-

gène, la seconde peut en être séparée par lavage.

Quel rapport y a-t-il entre ces deux fractions du complément quant à la réaction d'hémolyse ?

Comme on le sait, la quantité de complément nécessaire pour l'hémolyse est en rapport inverse avec la quantité d'anticorps fixé : plus les globules rouges sont sensibilisés, moins il faut de complément. Le même rapport existe entre la fraction globulinique et la fraction albuminique du complément. Si la surface des globules rouges est peu préparée par la sensibilisatrice, il faut, pour l'adsorption ultérieure, une quantité relativement grande de la fraction globulinique et une faible quantité de la fraction albuminique ; au contraire, si la sensibilisation a été forte il faut relativement peu de la fraction globulinique et une plus grande quantité de la fraction albuminique.

Il existe des cas où la seule présence de ces deux fractions, en dehors de toute création d'anticorps artificiel spécifique (immunisation) suffit pour produire l'hémolyse. On attribue alors le phénomène à l'action d'hémolysines « naturelles ». Ainsi le sérum de bœuf hémolyse les globules rouges de cobaye.

Il ressort donc de toutes les recherches sur le rôle des deux premières fractions du complément et sur leurs rapports réciproques que ces fractions ne peuvent produire séparément l'hémolyse des globules rouges, mais que pour ce faire elles sont toutes les deux nécessaires.

b) PARTIE PRATIQUE.

**Technique de la dissociation
des deux premières fractions du complément.**

**Preuve de leur existence par la méthode
de la restitution du pouvoir complémentaire.**

Depuis la découverte de Ferrata, plusieurs procédés ont été élaborés pour dissocier ces deux premières fractions du complément. Nous ne présenterons ici que trois techniques devenues classiques.

1^o Procédé de Liefmann modifié.

Le sérum frais de cobaye est dilué à 1/10 dans l'eau distillée glaciale. On fait passer un courant de gaz carbonique pendant 10 à 15 minutes, jusqu'à formation d'un précipité. On centrifuge à 3.000 tours pendant 10 minutes : on décante le liquide surnageant, qui contient la partie albuminique du sérum ; on rétablit l'isotonie par addition à 10 cc. de liquide de 1 cc. d'une solution concentrée de chlorure de sodium à 8,5 %. On recueille le dépôt (qui contient la partie globulinique), on le lave à l'eau distillée glaciale saturée d'anhydride carbonique et on le dissout dans l'eau physiologique à 0,8 %. On a ainsi dissocié les deux fractions du complément.

Dans toutes nos expériences, c'est cette technique que nous avons employée.

2^o Technique de dialyse de Ferrata.

Le sérum frais de cobaye est dialysé pendant 24 heures dans l'eau courante (sac de collodion). On sépare par

centrifugation le liquide surnageant (albumine) du sédiment (globuline). On procède d'une manière identique à celle que nous avons indiquée dans la technique au gaz carbonique.

3^o *Procédé de Sachs et Altmann.*

Ces auteurs dissocient les deux fractions par HCl faible. On mélange 1 partie de sérum frais de cobaye avec 8,2 parties de HCl N/300 (dans l'eau distillée). On laisse 1 heure à la température ordinaire. On centrifuge pour séparer les deux fractions. On traite le sédiment de la même manière qu'en 1^o et 2^o. On ajoute au liquide surnageant 0,8 partie de NaOH N/30 (dans une solution de NaCl à 10 %) pour neutraliser, puis on ajoute la solution de NaCl jusqu'à l'isotonie.

Telles sont les trois méthodes principales de dissociation des fractions C'_1 et C'_2 . Il en existe des modifications (Braun, Ledingham et Dean, Pollerie, etc.) ; mais les principes restent les mêmes : C'_1 reste dans la partie globulinique (dépôt) et C'_2 dans la partie albuminique (liquide surnageant).

La dissociation des deux fractions peut s'opérer avec tous les sérums doués de pouvoir complémentaire. On a pu réussir également cette séparation avec le sérum d'animaux à sang froid.

Ainsi que nous l'avons dit plus haut, ces deux fractions sont indispensables pour l'hémolyse. Si on mélange la partie globulinique avec les globules rouges de mouton sensibilisés, on n'obtient pas d'hémolyse. De même, si l'on ajoute aux globules rouges la partie

albuminique seule. Pour obtenir l'hémolyse, les deux fractions doivent être employées ensemble.

Voici l'expérience classique.

a) Après avoir lavé à l'eau distillée froide la partie globulinique isolée par un des procédés mentionnés plus haut, on la dissout dans une faible quantité d'eau physiologique; on mélange ce liquide en quantité correspondant à 1 cc. de complément à 1 : 10 (0,1) avec les globules rouges sensibilisés. On n'obtient pas d'hémolyse.

b) Le liquide surnageant contenant la fraction albuminique, devenue isotonique par addition de NaCl concentré, est ajouté en quantité correspondant à 1 cc. de sérum de cobaye à 1 : 10 aux globules rouges sensibilisés. On n'obtient pas d'hémolyse.

Si on mélange préalablement ces deux fractions, on obtient l'hémolyse.

Les deux fractions globulinique et albuminique sont thermolabiles : le chauffage à 56° pendant 30 minutes les détruit. Le sérum frais chauffé ainsi perd son pouvoir alexique.

B. — FRACTIONS THERMORÉSISTANTES (C'₃, C'₄, C'₅).

1. Troisième fraction (C'₃).

c) PARTIE THÉORIQUE.

On savait depuis longtemps que le sérum sanguin adsorbé par la levure perd son pouvoir alexique.

Coca a montré (1914) que ce sérum devient de nouveau actif si on le mélange avec du sérum chauffé à 56°, c'est-à-dire avec du sérum dont les fractions C'_1 et C'_2 ont été détruites.

Ritz (1912), étudiant l'action du venin de cobra sur l'alexine, constata que ce venin agit sur le complément frais en le privant de sa propriété alexique.

De nombreuses recherches ont montré que la levure détruit une fraction du complément qui n'est ni C'_1 , ni C'_2 , ce qui obligeait alors à admettre l'existence dans le complément d'une troisième fraction active. On constata ensuite que cette 3^e fraction peut être détruite, non seulement par la levure et le venin de cobra, mais encore par le venin de vipère (Yamagouchi et Saito), par l'extrait de certains organes, par certains bacilles. Au laboratoire de sérologie de l'Institut Pasteur, nous avons également constaté que le formol (aldéhyde formique) possède une action inhibitrice sur la 3^e fraction.

Cette 3^e fraction est relativement thermorésistante : le chauffage à 56° pendant 30 minutes ne la détruit pas, mais elle est détruite par chauffage à 60° pendant 15 minutes.

De nombreuses expériences ont prouvé que cette fraction joue un rôle tout à fait spécial. Elle est indispensable pour l'hémolyse, mais elle ne diminue pas quantitativement au cours du processus. Elle ne se fixe pas sur les globules rouges sensibilisés, n'est pas adsorbée par la sensibilisatrice, même dans le cas où les globules sont fortement sensibilisés ou « persen-

sibilisés » (Ritz). Elle joue donc le rôle d'un enzyme (catalyseur). On l'a rencontrée non seulement dans le sérum de cobaye, mais aussi dans d'autres sérums. Le sérum de porc est très riche en C'_3 ; il est aussi très riche en hémolysines naturelles pour les globules rouges de mouton et de cobaye.

Il faut noter que l'absence de pouvoir alexique qu'on observe chez certains cobayes est un caractère héréditaire récessif. Ce défaut de pouvoir alexique est dû à l'absence de la 3^e fraction (Hyde, 1923).

Un fait est particulièrement intéressant : le pouvoir alexique absent d'un sérum peut lui être restitué par une petite quantité de sérum frais humain, de cobaye, de mouton, de chat ou de lapin, alors que le sérum de bœuf, de porc, de poulet, de pigeon, de chèvre, de souris et de grenouille sont incapables d'activer un sérum privé de pouvoir alexique.

d) PARTIE PRATIQUE.

Action inhibitrice de diverses substances sur la troisième fraction (C'_3).

Comme nous l'avons mentionné, le venin de cobra, la levure, les extraits de certains organes, l'émulsion de certains microbes (*B. prodigiosus*), certains corps chimiques (sel $Na_2S_2O_4$ crystal), etc. inhibent le pouvoir alexique en agissant sur la 3^e fraction.

Voici les méthodes par lesquelles on obtient l'inhibition du pouvoir complémentaire par action de ces substances sur la 3^e fraction.

a) *Action du venin de cobra.*

On mélange 1 cc. de sérum de cobaye avec 0,4 cc. de venin de cobra 1/6 % (dans du NaCl à 0,9 %). On place à l'étuve à 37° pendant 1 h. 1/2, puis on ajoute 0,6 cc. de NaCl à 0,9 %. On effectue la réaction d'hémo-lyse en tenant compte du titre primitif du sérum.

b) *Action de la levure.*

Nous employons la levure de boulangerie telle quelle ou une souche de levure de l'Institut Pasteur. Nous n'avons pas constaté de différence entre la levure telle quelle et celle obtenue par ensemencement sur les milieux appropriés.

Dans toutes nos expériences, nous avons procédé comme suit :

On prépare un extrait de levure dans l'eau physiologique : 2 gr. de levure + 5 cc. d'eau physiologique. La quantité de levure doit être rigoureusement déterminée par titrage préalable ; l'excès de levure peut agir sur la réaction de restitution du pouvoir alexique. On place 1 heure à l'étuve, on centrifuge, on lave le sédiment, on le reprend, on prépare une suspension à 20 % dans l'eau physiologique. Puis on procède de la façon suivante : 2 cc. de sérum frais de cobaye + 0,5 de la suspension ainsi préparée sont laissés 20 minutes à l'étuve à 37°. On centrifuge et on étudie les modifications du complément dans le liquide surnageant.

c) *Action du formol.*

Nous avons également constaté que le formol (aldéhyde formique), mis en contact avec le sérum frais de cobaye, inhibe le pouvoir alexique de celui-ci. Cette observation a été le point de départ de recherches nouvelles ; nous nous sommes demandé quelle était la fraction du complément qui était inactivée par le formol.

Nous avons employé la technique suivante :

L'absence du pouvoir alexique est prouvée comme suit :

2 cc. de sérum frais de cobaye préalablement traité par des solutions plus ou moins concentrées de formol sont mis en présence de 0,5 cc. d'une émulsion de globules rouges de mouton lavés à 2,5% et de sérum hémolytique chauffé de lapin à 10-20 unités hémolytiques, volume 1 cc. On laisse ce mélange à l'étuve à 37° pendant 30 minutes et on constate que l'hémolyse ne s'est produite dans aucune tube (consulter la remarque en fin de chapitre, p. 40).

Dans l'expérience suivante, nous avons employé une dilution à 0,1 % de formol ordinaire. On mélange 1 cc. de sérum frais de cobaye avec une faible quantité (0,1 cc.) de formol à 0,1 % on laisse 30 minutes à l'étuve à 37° : le sérum a alors perdu son pouvoir alexique.

Nous nous sommes alors posé la question de savoir sur quelle fraction du complément se fixe le formol, quelle fraction a perdu son activité. Nous avons eu

recours à la technique de restitution du pouvoir complémentaire.

Avant d'exposer cette technique, nous résumerons dans le tableau schématisé suivant (tableau II) l'action empêchante des différentes substances sur le complément frais (avec indication des fractions inactivées correspondantes).

TABLEAU II.

Sérum de cobaye	Fractions inactivées	Tubes					
		1	2	3	4	5	6
Frais	Néant	0,1					
Chauffé	C'₁ et C'₂		0,1				
+ Levure	C'₃			0,1			
+ Formol	C'₄				0,1		
+ Ammoniaque.	C'₅					0,1	
+ Benzine.....	C'₆						0,1
Globules rouges de mouton à 5 %, sensibilisés.....		0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Eau physiologique.....		1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9
Etuve à 37°....		»	»	»	»	»	»
Résultats.....		H+	Ho	Ho	Ho	Ho	Ho

Lire : H+ = hémolyse ; Ho = pas d'hémolyse.

Le tableau suivant (tableau III) donne le schéma de la restitution du pouvoir complémentaire (hémolyse des globules rouges sensibilisés) préalablement détruit par divers procédés.

TABLEAU III

Restitution du pouvoir complémentaire.

Sérum de cobaye	Fractions inactivées	Tubes							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Chauffé.....	$C'_1 + C'_2$	0,1					0,1	0,1	0,1
+ Levure....	C'_3		0,1			0,1	0,1		
+ Formol....	C'_3				0,1	0,1		0,1	
+ Ammoniaque.....	C'_4	0,1	0,1	0,1	0,1				
+ Benzine....	C'_5			0,1					0,1
Globules rouges sensibilisés.....		0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Eau physiologique.....		1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Etuve à 37° 1 heure....		»	»	»	»	»	»	»	»
Résultats....		H+	H+	H+	H+	Ho	H+	H+	H+

Lire : H+ = hémolyse ; Ho = pas d'hémolyse.

Comme on le voit dans ce tableau, deux sérums se réactivent réciproquement lorsqu'ils ne sont pas tous deux dépourvus de la même fraction.

Autrement dit, si une fraction du complément est détruite par la chaleur ou par une substance agissant exclusivement sur cette fraction, le pouvoir alexique peut être restitué par addition d'une dose de complément dans lequel la fraction étudiée n'est pas détruite. Ainsi par exemple, les deux fractions C'_1 et C'_2 sont inactivées par la chaleur, elles ont perdu

leur pouvoir alexique. Si on mélange 0,1 cc. de ce complément privé de C'_1 et C'_2 avec 0,1 cc. de complément privé de C'_3 par l'action de la levure mais qui a conservé intactes les fractions C'_1 et C'_2 , on restitue au mélange son pouvoir alexique, suivant le schéma :

- a) $[C'_1 C'_2] C'_3 \dots$ où C'_1 et C'_2 sont inactivés par la chaleur ;
b) $C'_1 C'_2 [C'_3] \dots$ où C'_3 est détruit par la levure.

Si on mélange a) et b), le pouvoir alexique est restitué. Les fractions C'_1 et C'_2 , absentes dans le premier tube (a) sont restituées par C'_1 et C'_2 du second tube (b). C'_3 , absent du second tube (b) est restitué par C'_3 du premier tube (a).

Mais si on mélange 0,1 cc. de complément dont la fraction C'_3 a été détruite par l'action de la levure avec 0,1 cc. d'un autre complément dont la même fraction C'_3 a été détruite par le formol, ou le venin de cobra, le mélange reste inactif, parce que dans les deux tubes la même fraction fait défaut ; la restitution du pouvoir complémentaire n'a pas lieu et l'hémolyse ne se produit pas.

Nous avons utilisé cette technique pour déterminer laquelle des 5 fractions actuellement connues est détruite par le formol et est responsable de la perte du pouvoir alexique.

Nous avons pu constater que le formol détruit la fraction C'_3 , c'est-à-dire qu'il agit sur la même fraction que le venin de cobra, la levure, etc.

Nous avons d'autre part procédé à l'expérience suivante :

On met dans deux tubes des sérums de cobaye : dans le premier tube (a) un sérum dont les fractions C'_1 et C'_2 sont détruites par la chaleur et C'_3 par la levure ; dans le tube b), du sérum frais de cobaye + du formol.

a) [C'_1 C'_2 C'_3].

b) C'_1 C'_2 C'_3 + formol.

Si on mélange a) et b) et qu'on fasse agir ce mélange sur les globules rouges sensibilisés, on n'obtient aucune hémolyse. Etant donné que C'_1 et C'_2 du tube a) sont remplacés par C'_1 et C'_2 du tube b), il est évident que c'est la fraction C'_3 qui fait défaut. Par conséquent le formol a inactivé la fraction C'_3 du tube b).

Enfin, si on prépare le mélange suivant dans 2 tubes :

c) tube dans lequel les deux premières fractions C'_1 et C'_2 sont inactivées par la chaleur, la troisième fraction, C'_3 , restant intacte ;

d) tube contenant du sérum de cobaye (préalablement titré par rapport aux deux premières fractions) + formol, c'est-à-dire contenant les fractions C'_1 et C'_2 mais dépourvu de fraction C'_3 ,

soit : c) [C'_1 C'_2] C'_3

d) C'_1 C'_2 [C'_3]

qu'on mélange le contenu des deux tubes et qu'on fasse agir ce mélange sur les globules rouges sensi-

bilisés, on observe l'hémolyse. Par conséquent les fractions C'_1 et C'_2 du tube *c*) sont restituées par C'_1 et C'_2 du tube *d*), et le sérum du tube *d*), qui avait perdu son pouvoir alexique par destruction de la fraction C'_3 par le formol, le récupère par addition de la fraction C'_3 du tube *c*).

Enfin nous avons observé un phénomène extrêmement intéressant : si on chauffe le sérum frais du cobaye (ce qui détruit les fractions C'_1 et C'_2 , puis qu'on fasse agir la levure sur ce sérum chauffé, celle-ci ne détruit pas la fraction C'_3 ; pour inactiver cette fraction, il faut faire agir la levure sur le sérum frais avant le chauffage.

Ceci constitue une différence entre l'inactivation de la fraction C'_3 par la levure et son inactivation par le formol : le formol détruit la fraction C'_3 même si le sérum est préalablement chauffé.

Cette constatation prouve la complexité de la fraction C'_3 . Cette fraction, sous l'influence du chauffage, se transforme et n'adsorbe pas les polysaccharides de la levure, tandis que cette même fraction peut être détruite par l'action du formol même après chauffage. On est ainsi amené à penser que la fraction C'_3 serait constituée de 2 parties, le formol n'en détruisant qu'une et la levure détruisant les deux.

Il faut admettre que les substances thermolabiles du complément sont indispensables pour que la levure puisse agir sur la fraction C'_3 , que la chaleur exerce une action inhibitrice plus ou moins forte sur le pouvoir empêchant de la levure. L'inactivation du

complément au moyen de la levure ne peut se faire qu'avec la participation des substances thermolabiles du sérum frais. On peut supposer que, dans le sérum inactivé à 56° pendant 30 minutes, se produit une floculation des colloïdes protecteurs.

On observe d'ailleurs un phénomène analogue dans la précipitation de la toxine diphtérique par le sérum antidiphtérique : si on chauffe le sérum antidiphtérique, on observe un changement du titre de floculation et un retard dans l'apparition et la formation des précipitines spécifiques.

L'étude de la 3^e fraction présente un intérêt biologique tout spécial. Quel rôle joue cette partie du complément dans l'immunoréaction ? C'est un problème qui n'est pas encore résolu. Nous savons qu'elle est indispensable pour la réalisation des réactions de fixation du complément, pour l'hémolyse des globules rouges sensibilisés. Nous avons constaté qu'on retrouve cette fraction après l'hémolyse en même quantité qu'avant la réaction, qu'on ne peut jamais observer sa diminution au cours de la réaction. Elle n'est pas fixée sur le complexe antigène-anticorps (globules rouges de mouton + sensibilisatrice) même si les globules rouges sont hypersensibilisés.

Remarque. — La méthode de « restitution du pouvoir complémentaire » nous a permis de constater, de plus, que les fortes dilutions de formol (allant jusqu'à 1 %) inhibent non seulement la fraction C'₃ mais encore les fractions C'₁ et C'₂. Par contre le formol en dilution faible n'agit que sur la fraction C'₃.

2. Quatrième fraction (C'₄).

e) PARTIE THÉORIQUE.

En 1926, Gordon, Whitehead et Wormall, étudiant l'action des enzymes protéolytiques sur le complément, constatèrent que ce dernier peut être inactivé par l'action de l'ammoniaque ou de certains sels ammoniacaux (P. ex. $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$). Ils observèrent que ces produits n'agissent pas sur les fractions C'₁, C'₂ et C'₃ et conclurent à la présence dans le sérum frais d'une nouvelle fraction qu'ils appelèrent quatrième fraction (C'₄). Une série d'auteurs ont confirmé depuis cette constatation.

En étudiant l'action de l'ammoniaque et des sels d'ammonium, et, en employant la méthode de restitution du pouvoir alexique exposée plus haut, nous avons confirmé que :

1^o la fraction découverte par Gordon, Whitehead et Wormall diffère bien des trois premières fractions : de C'₁ et C'₂ par sa thermostabilité, de C'₃ par le fait qu'elle n'est pas détruite par la levure, le venin de cobra, le formol, etc ;

2^o que l'adjonction à un sérum inactivé par l'ammoniaque ou les sels ammoniacaux d'un sérum chauffé ou privé de C'₃ restitue, au mélange ainsi obtenu, le pouvoir complémentaire.

En dehors de l'ammoniaque et de certains sels ammoniacaux, d'autres substances détruisent encore

la fraction C'₄ : le chloroforme, l'éther, le venin de Botrop (B. jararaca), l'hydrazine, le chlorure de cadmium. Enfin la chaleur exerce aussi une action : après chauffage prolongé (1 heure à 56°), on constate la disparition complète ou presque de la fraction C'₄. A 65°, elle est complètement détruite en 30 minutes. Après séjour de 19 heures à la glacière, le sérum frais perd 50 % de son pouvoir complémentaire, ce qui est dû à l'action du froid sur la 4^e fraction.

L'acidité et l'alcalinité fortes détruisent la 4^e fraction, surtout si le sérum est placé à la température de 37 degrés pendant 2 heures. Le meilleur pH pour la réaction se trouve entre 8,0 et 9,0.

On a constaté, de plus, l'existence d'un rapport entre la fraction C'₄ et les sels de calcium dans le sang. Les sérums très pauvres en calcium, ne contiennent pas la 4^e fraction C'₄.

f) PARTIE PRATIQUE.

Nous exposerons brièvement les diverses techniques de l'inactivation de la fraction C'₄ par différentes substances.

a) *Action de l'ammoniaque* (procédé de Gordon, Whitehead et Wormall et Deissler).

- 1 cc. de sérum frais de cobaye
- + 0,25 cc. d'ammoniaque N 6,5
- 1 h. à 1 h. 1/2 à l'étuve à 37°
- + 0,25 cc. HCl N, 6,5 (pour neutraliser)
- + NaCl physiologique q. s. pour 21 cc.

2° Action de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (procédé de Tokunaga).

1 cc. de sérum frais de cobaye

+ 0,008 g. $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$

laisser 24 heures à la température du laboratoire (18-20°).

b) *Action du chloroforme et de l'éther* (méthode de Toda et Mitsuse).

3 cc. de sérum frais de cobaye

mélanger avec la même quantité de chloroforme ou d'éther ; agiter modérément, laisser reposer le mélange pour que l'éther ou le chloroforme se dégagent du sérum, reprendre le sérum avec une pipette et le verser dans une capsule en porcelaine, laisser à l'air pour que l'éther ou le chloroforme s'évaporent.

c) *Action du chlorure de cadmium* (procédé de Toda et Mitsuse).

Etant donné que le chloroforme, l'éther inactivent la fraction C'_4 , on pouvait supposer que C'_4 possède la propriété de s'unir à la lécithine. Or on sait depuis longtemps que le cadmium a une grande affinité pour la lécithine. Partant de ces prémisses on a essayé d'inactiver le complément par le sel de cadmium. On a employé la technique suivante :

0,1 cc. de sérum de cobaye dilué 10 fois dans H_2O physiologique à 0,85 %

+ 2,9 cc. de solution de chlorure de Cd à 1 % dans H_2O physiologique, laisser 12 heures à la température ordinaire.

La réaction de restitution prouve que c'est la

4^e fraction qui a été inactivée par le chlorure de cadmium.

Preuve de l'existence de la 4^e fraction.

Lorsqu'on mélange un sérum dans lequel la 3^e fraction a été détruite (par la levure, le venin de cobra) avec un sérum dans lequel la 4^e fraction a été inactivée (par l'ammoniaque, l'éther, etc...) on observe l'hémolyse. On pouvait donc supposer que le pouvoir complémentaire du premier sérum était restitué par celui du second et réciproquement. Dans une longue série d'expériences nous avons pu confirmer qu'il en est bien ainsi et que ces deux sérums se complètent réciproquement.

Dans le tableau suivant (tableau IV), nous présentons le procédé que nous avons élaboré pour confirmer par la méthode de restitution, l'existence de la 4^e fraction qui se distingue des autres fractions connues.

On prépare plusieurs séries de tubes. Dans chacune des séries la fraction C'₃ ou la fraction C'₄ a été inactivée par divers procédés. A chacun des tubes des différentes séries, on ajoute du sérum de cobaye dans lequel une fraction différente a été détruite. Puis on effectue la réaction :

On ajoute 0,5 cc. de globules rouges de mouton sensibilisés et on complète à 2,0 cc. avec de l'eau physiologique et on met toutes les séries de tubes à l'étuve pour 30 minutes.

TABLEAU IV

A 0,25 cc. de sérum de cobaye inactivé par	On ajoute 0,25 cc. de sérum de cobaye inactivé par	Fraction inactivée dans le 2 ^e sérum	Globules rouges + eau physiologique Etuve	Résultats
Levure (C' ₃ inactivé)	Chauffage	C' ₁ et C' ₂	»	H+
	Venin de Cobra	C' ₃	»	Ho
	Levure	C' ₃	»	Ho
	Ammoniaque	C' ₄	»	H+
	Ether	C' ₄	»	H+
Ammoniaque (C' ₄ inactivé)	Chauffage	C' ₁ et C' ₂	»	H+
	Venin de Cobra	C' ₃	»	H+
	Levure	C' ₃	»	H+
	Ammoniaque	C' ₄	»	Ho
	Ether	C' ₄	»	Ho
Sulfate d'ammo- nium (C' ₄ inactivé)	Chauffage	C' ₁ et C' ₂	»	H+
	Venin de Cobra	C' ₃	»	H+
	Levure	C' ₃	»	H+
	Ammoniaque	C' ₄	»	Ho
	Ether	C' ₄	»	Ho
Ether (C' ₄ inactivé)	Chauffage	C' ₁ et C' ₂	»	H+
	Venin de Cobra	C' ₃	»	H+
	Levure	C' ₃	»	H+
	Ammoniaque	C' ₄	»	Ho
	Ether	C' ₄	»	Ho

Lire : H + = hémolyse ; Ho = pas d'hémolyse.

Cette méthode de « restitution du pouvoir complémentaire » démontre clairement que le sérum inactivé par l'Ammoniaque, le Sulfate d'Ammonium, l'Ether et le Chlorure de Cadmium (ce dernier n'a pas été porté sur le tableau IV) retrouve son pouvoir complémentaire grâce à l'addition d'un sérum inactivé, lui aussi, mais par le venin de Cobra, la levure ou la chaleur.

En conséquence, la fraction détruite dans le premier sérum diffère de celles détruites dans le second,

c'est-à-dire des fractions C'_3 , C'_1 et C'_2 . Il s'agit donc bien d'une nouvelle fraction C'_4 .

3. Cinquième fraction (C'_5).

g) PARTIE THÉORIQUE.

Takahashi et Tokunaga constatèrent que la benzine peut inactiver le pouvoir complémentaire du sérum de cobaye ; mais ces auteurs n'approfondirent pas leurs recherches et n'indiquèrent pas sur quelle fraction du sérum agit la benzine.

Etant donné que la benzine est un solvant des lipoïdes, de même que l'éther et le chloroforme qui inactivent la 4^e fraction, il était logique de penser que l'action de la benzine s'exerçait également sur cette 4^e fraction. Mais nos recherches, que nous exposerons dans la partie pratique, nous ont montré que c'était, non pas la 4^e fraction qui était détruite par la benzine, mais bien une fraction nouvelle, une 5^e fraction, ou C'_5 .

Toda et Mitsuse ont les premiers observé que la fraction sur laquelle agit la benzine n'est pas détruite par le chauffage à 100° pendant 1 heure. Il ne pouvait donc s'agir ni de C'_1 ou C'_2 , qui sont thermolabiles, ni de C'_3 ou C'_4 qui, bien que relativement thermostables, sont détruites au-dessous de cette température. Il fallait donc conclure à l'existence d'une 5^e fraction due à la présence dans le sérum d'une substance coctostable qui, de plus, n'est pas influencée

par les facteurs qui inactivent la 3^e et la 4^e fractions. En dehors de la température, le procédé de la restitution montre, en effet, qu'il s'agit d'une nouvelle fraction du sérum de cobaye.

Cette fraction, inactivée par la benzine, peut être réactivée par le sérum de cobaye chauffé à 100° (1) ou par des sérums privés des fractions C'3 ou C'4.

h) PARTIE PRATIQUE.

Nous avons procédé aux expériences suivantes pour étudier l'action de la benzine sur la 5^e fraction.

On mélange 2 cc. de sérum frais de cobaye avec de la benzine *ana*. Ce mélange s'effectue à la température du laboratoire, dans un agitateur électrique pendant 15 à 20 minutes; on laisse reposer quelques minutes jusqu'à séparation de la benzine et du sérum; on décante avec une pipette le sérum qu'on verse dans une capsule en porcelaine; on laisse 1 à 2 heures à l'air jusqu'à évaporation complète de la benzine. Si on effectue la réaction d'hémolyse avec le sérum ainsi préparé, on constate l'absence d'hémolyse: le sérum a perdu son pouvoir complémentaire.

Après avoir fait cette constatation, qui confirmait les résultats de Takahashi et Tokunaga, nous nous sommes posé la question de savoir quelle était la fraction du sérum inactivée par la benzine. Dans ce but,

(1) Pour récupérer le complément du sérum chauffé à 100°, nous avons eu recours à la technique que Dujarric et Kossovitch ont préconisée dans leur travail sur la préparation des antisérums au moyen de coctosérum. V. *Ann. de l'I. P...*, 1940, vol. 65, p. 63.

nous avons eu recours au procédé de la restitution, technique que nous avons utilisée dans nos recherches sur les autres fractions (voir tableau V).

TABLEAU V

Le tableau suivant schématise notre procédé de restitution de la fraction inactivée par la benzine.

A 0,25 cc. de sérum de cobaye inactivé par	On ajoute 0,25 cc. de sérum de cobaye inactivé par	Globules rouges, eau physiolo- gique, étuve	Résultats
	Venin de Cobra	•	H+
B	Levure	•	H+
E	Formol	•	H+
N	Ammoniaque	•	H+
Z	SO ₄ (NH ₄) ₂	•	H+
I	Ether	•	H+
N	Chauffage	•	H+
E	Pas de sérum mais 0,25 cc. d'eau physiologique	•	Ho

Lire : H + = hémolyse ; Ho = pas d'hémolyse.

Dans une série de 8 tubes, on verse 0,25 cc. de sérum de cobaye inactivé par la benzine (comme il est décrit plus haut) et dilué à 1 : 10. Dans chaque tube, on verse 0,25 cc. de sérum de cobaye inactivé par différents facteurs : chauffé à 56°, inactivé par le venin de cobra, par la levure, le formol, l'ammoniaque, le sulfate d'ammonium, le chloroforme, l'éther ; dans le dernier tube (tube témoin) on met 0,25 cc. d'eau physiologique.

Après avoir préparé ces mélanges, on agite les tubes, on ajoute 0,5 cc. de globules rouges de mouton sensibilisés et on complète à 2 cc. avec de l'eau physiologique. On met tous les tubes à l'étuve à 37° pendant 30 minutes et on lit les résultats de l'hémolyse.

Comme il ressort de ce tableau, le pouvoir complémentaire d'un sérum inactivé par la benzine peut être restitué par les sérums dont les fractions C'_1 , C'_2 , C'_3 et C'_4 ont été détruites. Par conséquent, la fraction détruite par la benzine n'est aucune de ces 4 fractions, c'est une 5^e fraction : C'_5 ; la substance détruite par la benzine se trouve dans la partie du sérum qui résiste au chauffage à 100°.

IV

Sur quelle partie du sérum sont fixées les diverses fractions du complément.

Fractions thermolabiles.

(C'₁ et C'₂).

Comme nous l'avons déjà mentionné, la fraction C'₁, ou chaînon moyen, est fixée sur la partie globulinique du sérum; la fraction C'₂ ou chaînon terminal, est fixée sur la partie albuminique. Une série de procédés prouve cette fixation. Le procédé de Liefmann — précipitation de la partie globulinique par CO₂ — et sa séparation de la partie albuminique est le plus utilisé. Le procédé de la dialyse du sérum de Ferrata ou celui de Sachs, qui emploie HCl dilué; donnent le même résultat: disjonction des deux fractions par séparation de la globuline et de l'albumine.

Fractions thermostables.

3^e FRACTION (C'₃).

Les résultats des recherches effectuées par une série d'auteurs sur la partie du sérum qui fixe la 3^e fraction ont provoqué des discussions. D'après Sachs et

ses collaborateurs, le pouvoir complémentaire du sérum de cobaye inactivé par le venin de cobra, par des suspensions de bacilles ou par la levure, etc... peut être restitué, soit par la fraction albuminique, soit par la fraction globulinique du sérum. D'autre part, Take-nomata a constaté que la 3^e fraction est fixée sur la partie globulinique.

Cette opinion a été partagée par Gordon, Whitehead et Wormall, mais n'a pu être confirmée par Deissler.

Nous avons également entrepris une série de recherches sur cette question. Voici le procédé que nous avons élaboré :

Nous dédoublons le sérum frais de cobaye en ses deux parties : globuline et albumine. Nous avons eu recours à la technique de Liefmann, que nous avons décrite plus haut et qui nous a servi pour la séparation des deux fractions thermolabiles, C'₁ et C'₂.

2 cc. de sérum frais de cobaye sont mélangés avec 8 cc. d'eau distillée. On fait agir CO₂ pendant 20 minutes. On centrifuge le mélange et on obtient ainsi un dépôt et un liquide surnageant, on les sépare par décantation, on lave plusieurs fois le sédiment avec de l'eau distillée froide et on le dissout dans une quantité minime d'eau physiologique. On ajoute au liquide surnageant la quantité de solution NaCl concentrée nécessaire pour obtenir l'isotonie.

Après avoir préparé ces deux parties du sérum, nous inactivons le sérum frais de cobaye en faisant agir la levure, qui détruit la 3^e fraction. Dans deux séries de tubes à hémolyse on ajoute : dans la pre-

mière des doses décroissantes de « CO₂-globuline » dissoute dans l'eau physiologique et dans la seconde, des doses décroissantes de « CO₂-albumine isotonisée. » On ajoute dans tous les tubes 0,25 cc. de complément à 1/10, privé de sa 3^e fraction, on mélange très soigneusement les tubes et on verse 0,50 cc. de globules rouges de mouton sensibilisés ; on complète à 2 cc. avec de l'eau physiologique ; on met à l'étuve à 37° pendant 30 minutes et on lit les résultats. Le tableau suivant résume ces résultats (tableau VI).

TABLEAU VI

Sérum de cobaye privé de sa 3 ^e fraction + séroglobuline de cobaye	Résultats	Sérum de cobaye privé de sa 3 ^e fraction + séroalbumine de cobaye	Résultats
0,20	+++	0,20	++
0,10	+++	0,10	+
0,05	++	0,05	o
0,025	+/-	0,025	o

+++ = Hémolyse complète
 ++ = Hémolyse presque complète
 + = Hémolyse faible
 +/- = Douteux
 o = Pas d'hémolyse

Comme il ressort de ce tableau, la 3^e fraction est fixée sur la partie globulinique du sérum, mais on constate cependant aussi une certaine hémolyse dans la partie albuminique.

Nous pouvons donc conclure de nos recherches que la plus grande partie de la 3^e fraction est fixée sur la partie globulinique du sérum, et une petite partie seulement sur la partie albuminique.

Dans une autre série d'expériences, nous avons constaté que ce sont les polysaccharides insolubles de la levure qui fixent la 3^e fraction et l'inactivent.

4^e FRACTION (C'₄).

Nous avons employé la même technique que pour la 3^e fraction.

Après avoir séparé les deux fractions globulinique et albuminique par le procédé classique de Liefmann, nous avons préparé le complément privé de sa 4^e fraction par le sulfate d'ammonium.

On dissout le précipité, on rend isotonique le liquide surnageant par NaCl concentré ; on y ajoute du sérum de cobaye privé de la 4^e fraction, des globules rouges sensibilisés, on complète à 2 cc. avec de l'eau physiologique, on met à l'étuve à 37° pendant 30 minutes et on lit les résultats. Dans aucun cas nous n'avons constaté d'hémolyse dans la partie globulinique, alors qu'elle se produisait toujours dans la partie albuminique.

Ces expériences nous ont donc montré que la 4^e fraction est fixée sur les albumines du sérum.

5^e FRACTION (C'₅).

Nous avons procédé comme pour les fractions C'₃ et C'₄. La séparation des parties albumine et globu-

line est effectuée par CO_2 , la destruction de la 5^e fraction, par la benzine. Un procédé analogue à celui employé pour les fractions C'_3 et C'_4 nous a prouvé que la fraction C'_5 est fixée entièrement sur la partie albuminique du sérum. C'est cette partie qui donne l'hémolyse dans le mélange partie albuminique + complément privé de sa 5^e fraction + globules rouges de mouton sensibilisés.

RÉSUMÉ.

Des expériences des différents auteurs et des nôtres, on peut donc conclure que la 1^{re} fraction est fixée sur la partie globulinique du sérum, la 2^e fraction sur la partie albuminique, la 3^e en grande partie sur la partie globulinique et en petite quantité sur la partie albuminique, les 4^e et 5^e fractions entièrement sur la partie albuminique.

V

Action de la chaleur sur les différentes fractions du complément (amplitude thermique).

Il est classique que le chauffage du sérum à 56° pendant 25 à 30 minutes l'inactive en détruisant son pouvoir complémentaire. On utilise ce procédé dans toutes les réactions de fixation et de déviation du complément.

Nous avons voulu étudier d'une façon plus approfondie l'action de la chaleur sur les différentes fractions connues jusqu'ici. Dans ce but, nous avons préparé une série de sérums privés des diverses fractions.

Pour les fractions thermolabiles, C'_1 et C'_2 , nous avons eu recours à la technique classique de la séparation de la partie globulinique et albuminique ; nous l'avons exposée dans les chapitres précédents. Pour la 3^e fraction, nous l'avons inactivée par la levure ; la 4^e fraction a été inactivée par le sulfate d'ammonium et la 5^e par la benzine.

Voici le schéma de notre procédé :

C'_1 . — On mélange 0,25 cc. de la partie albuminique du sérum (contenant C'_2) avec 0,25 cc. de la partie

globulinique à 1 : 10 (contenant C'_1), chauffée à différentes températures pendant des temps variables : de 40° pendant 10 à 25 minutes à 60° pendant 10 à 30 minutes. On ajoute à ce mélange 0,5 cc. de globules rouges de mouton sensibilisés. On met à l'étuve à 37° pendant 30 minutes et on lit les résultats. On constate l'absence d'hémolyse dans tous les tubes. Par conséquent, la fraction globulinique (C'_1) est détruite à partir d'un chauffage de 40° pendant 10 minutes.

C'_2 . — Dans une série de tubes, on mélange la fraction globulinique (C'_1) avec la fraction albuminique (C'_2). Cette dernière est chauffée de 40° à 60° pendant 10 à 30 minutes. Après séjour de 30 minutes à l'étuve, on ajoute les globules rouges sensibilisés et on lit les résultats. On constate l'absence d'hémolyse dans les tubes dans lesquels C'_2 a été chauffé de 40° à 56° pendant 25 minutes, et l'hémolyse dans tous les autres tubes. Par conséquent C'_2 (fraction albuminique) n'est pas détruite par des températures allant jusqu'à 56° pendant 25 minutes.

C'_3 . — On mélange le sérum de cobaye privé de sa 3^e fraction par la levure avec le sérum de cobaye chauffé aux diverses températures, de 40° pendant 10 à 30 minutes à 60° pendant 10 à 30 minutes. On procède de la même façon que pour les deux premières fractions. On constate l'hémolyse dans les tubes où le sérum de cobaye a été chauffé entre 40° et 60° pendant 30 minutes ; dans ceux où le sérum a

été chauffé au-dessus de cette température, l'hémolyse n'a pas lieu. Par conséquent, la 3^e fraction du complément, dans le sérum de cobaye est détruite par un chauffage de 60° pendant 30 minutes.

C'₄. — En mélangeant dans une série de tubes du sérum de cobaye privé de sa 4^e fraction par le sulfate d'ammonium et du sérum de cobaye chauffé de 40° à 65° pendant 30 minutes et en procédant de la façon exposée plus haut, nous avons constaté que cette fraction est détruite par le chauffage à 60° pendant 30 minutes.

La 5^e fraction, C'₅, comme nous l'avons déjà mentionné est coctostable. Le pouvoir complémentaire du sérum de cobaye privé de la 5^e fraction par l'action de la benzine, mélangé au sérum de cobaye chauffé à 100°, est restitué par ce dernier.

Les fractions C'₁ et C'₄ se fixent sur le complexe antigène + sensibilisatrice entre 0° et 37°.

Presque à la même température se fixe la fraction C'₂.

La fraction C'₃ n'est pas adsorbée à basse température, ce qui explique l'absence de l'hémolyse dans les réactions effectuées à la glacière.

RÉSUMÉ.

Comme on le voit, la fraction C'₁ est la plus thermolabile ; puis viennent C'₂, C'₃, C'₄. La 5^e fraction C'₅ est de beaucoup la plus résistante à la chaleur puisqu'elle n'est pas influencée par la température de 100°.

VI

Ordre dans lequel sont adsorbées les diverses fractions du complément

Ainsi que nous l'avons vu, le complément n'est pas une substance chimique formée des deux fractions thermolabiles de Ferrata. L'activité complémentaire est le résultat de l'action conjuguée de tous les facteurs physico-chimiques composant le sérum sanguin. Nous avons vu que les globules rouges sensibilisés peuvent fixer la fraction globulinique (C'_1) sans être hémolysés et que, pour que leur hémolyse ait lieu, même après lavage à l'eau physiologique, l'addition de la fraction albuminique (C'_2) est nécessaire et suffisante.

Employant une méthode analogue à celle de Ferrata, nous avons pu prouver la fixation par les globules rouges sensibilisés non seulement de la fraction globulinique, mais aussi de la fraction albuminique, sans obtenir l'hémolyse lorsque le sérum frais a été préalablement dépourvu de la 3^e fraction. Ces globules rouges, après lavage soigneux, sont hémolysés par simple addition de sérum inactivé par chauffage. On appelle ces globules rouges qui ont adsorbé les

fractions C'_1 et C'_2 « hypersensibilisés » (Nattan).

Partant de cette constatation, nous pouvons considérer l'action du complément comme le résultat de l'adsorption de trois substances dans l'ordre suivant : globules rouges sensibilisés + fraction globulinique thermolabile (C'_1) + fraction albuminique thermolabile (C'_2) + fraction thermostable (C'_3).

Dans le but de vérifier ce résultat et pour vérifier l'ordre d'adsorption des diverses fractions par les globules rouges, nous avons effectué les expériences suivantes :

Le sérum frais de cobaye est réparti dans une série de tubes et chaque tube est traité par divers facteurs dans le but d'inactiver le pouvoir alexique des différentes fractions : levure, formol, ammoniacale. Une autre partie du même sérum est chauffée à 56° pendant 30 minutes.

D'autre part, on mélange 1 cc. de sérum chauffé à 56° pendant 30 minutes (sérum privé des fractions C'_1 et C'_2) avec 5 cc. d'émulsion de globules rouges sensibilisés ; après un contact d'une heure au bain-marie à 37° , on centrifuge, on lave plusieurs fois le sédiment et on complète finalement à 5 cc. avec de l'eau physiologique. L'émulsion de globules rouges ainsi préparée est répartie dans une série de tubes à la dose de 1 cc. dans chaque tube.

Voici le schéma de nos expériences.

On met ces tubes pendant 1 heure au bain-marie à 37° et on lit les résultats : dans les deux premiers

TABLEAU VII

Tube N°	A l'émulsion de globules rouges sensibilisés, contenant le sérum de cobaye privé de C' ₁ et C' ₂ et après lavage (a)	On ajoute le sérum de cobaye privé de la fraction (b)	Résultats
1	1 cc.	C' ₃ par la levurè 0,1 cc.	Ho
2	1 cc.	C' ₃ par le formol 0,1 cc.	Ho
3	1 cc.	C' ₄ p. ammoniacque 0,1 cc.	H +
4	1 cc. d'eau physiologique		Ho

Lire : H+ = Hémolyse.

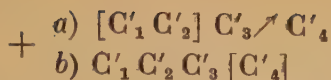
Ho = Pas d'hémolyse.

tubes et dans le 4^e tube (tube témoin), pas d'hémolyse ; dans le 3^e tube, hémolyse complète.

Il ressort de ces expériences que le complément inactivé par l'ammoniaque, c'est-à-dire privé de sa 4^e fraction, en fournissant aux globules rouges des tubes (a) les fractions C'₁, C'₂ et C'₃ suffit à provoquer l'hémolyse. C'₄ est donc la seconde fraction qui est adsorbée par les globules rouges sensibilisés, la première étant la fraction globulinique.

Nous pouvons expliquer ce résultat de la façon suivante : le tube n° 3, qui nous a donné l'hémolyse, contient le sérum chauffé (il est donc privé de C'₁ et C'₂) ; le lavage entraîne plus ou moins les autres fractions. On y ajoute le sérum de cobaye privé de sa 4^e fraction par l'ammoniaque et contenant C'₁, C'₂ et C'₃.

Voici l'état du tube n° 3.



Le mélange (a) + (b) donne l'hémolyse, parce que C'_1 et C'_2 de (a) inactivés par le chauffage, sont réactivés par C'_1 et C'_2 de b.

C'_4 de (b) est inactivé ; par conséquent c'est C'_4 de a) retenu par les globules rouges, qui, avec les autres fractions restituées, détermine l'hémolyse.

Les tubes n^o 1 et 2, où l'hémolyse est absente, montrent que ce n'est pas la 3^e fraction qui est adsorbée par les globules rouges sensibilisés.

En traitant de la même façon les globules rouges sensibilisés par des sérums dont les autres fractions avaient été détruites par les procédés habituels (levure, formol, etc.), nous sommes arrivé à déterminer l'ordre dans lequel se fixent ces différentes fractions sur le complexe globules rouges, + sensibilisatrice et qui est le suivant :

G.R. + sensibilisatrice + C'_1 + C'_4 + C'_2 + C'_5 + C'_3 .

Nous avons, de plus, constaté que la fraction C'_1 peut se fixer sur les globules rouges sensibilisés même en l'absence de la fraction C'_4 ; la fraction C'_4 ne se fixe pas en l'absence de C'_1 . Bien que la fraction C'_3 ne soit pas diminuée quantitativement dans le processus de la réaction d'hémolyse, sa présence lui est indispensable. Elle intervient après toutes les autres fractions connues à l'heure actuelle.

Le pouvoir alexique du sérum ne se manifeste donc qu'en présence de l'ensemble des fractions ou « com-

ponents » du complément (dont il reste toujours à déterminer le nombre total et la nature).

Ces fractions paraissent remplir vis-à-vis du complexe « antigène + anticorps » des fonctions propres à chacune, leurs fixations sur ce complexe, comme nous venons de le voir, se succédant selon un ordre bien défini. C'_3 , demeurant pratiquement libre, joue le rôle de catalyseur.

Conclusions générales.

En terminant cet aperçu général, nous voudrions dégager quelques points essentiels de notre étude du complément et de ses 5 constituants actuellement connus.

Une longue série d'expériences nous a permis les constatations suivantes :

1^o Le complément, non plus d'ailleurs que l'ambocepteur (qui est en réalité un polycepteur), n'est pas une substance biochimique homogène et déterminée, mais un complexe des fonctions de divers facteurs dont l'ensemble constitue le pouvoir complémentaire.

Ces fonctions, dont 5 ont été étudiées jusqu'à présent, peuvent être inactivées séparément par différents facteurs physico-chimiques et peuvent être restituées par conjonction de sérums différemment inactivés.

2^o Nous avons confirmé l'existence de la 5^e fraction et nous avons constaté que cette fraction est fixée sur la partie albuminique du sérum frais.

3^o La 3^e fraction peut être inactivée par le formol. Elle est, elle-même, composée d'au moins deux

parties : l'une sensible à l'action de la levure, l'autre sensible à l'action du formol. Le rôle de chacune de ces parties, comme d'ailleurs celui de la 3^e fraction, reste encore à étudier.

4^o La plus grande partie de la 3^e fraction est fixée sur la partie globulinique et une faible partie seulement sur la partie albuminique du sérum.

5^o Etudiant le rapport entre la sensibilisatrice et les diverses fractions du complément, nous avons constaté une affinité et une avidité entre le complexe antigène-anticorps et la 1^{re} fraction C'₁. Il semble que cette fraction crée les conditions nécessaires à la fixation des autres constituants dans les immuno-réactions.

Etudiant l'ordre dans lequel se fixent les différentes fractions du complément sur le complexe antigène-anticorps, nous avons observé l'ordre suivant : globules rouges + sensibilisatrice + fraction thermolabile globulinique (C'₁) + fraction thermorésistante C'₄ + fraction thermolabile albuminique C'₂ + fraction thermostable C'₅, et enfin 3^e fraction C'₃. Cette dernière fraction reste quantitativement inchangée ; elle joue le rôle d'un catalyseur.

Pour désigner les différentes fractions, nous avons employé dans notre travail, les synonymes suivants :

Pour la 1^{re} fraction :

Chaînon moyen, CO₂ globulinique, C'₁.

Pour la 2^e fraction :

Chaînon terminal, CO₂ albuminique, C'₂.

Pour la 3^e fraction :

Levure-sérum, C'₃.

Pour la 4^e fraction :

Ammoniaque-sérum, C'₄.

Pour la 5^e : fraction :

Benzine-sérum, C'₅.

Vu : le Président de la thèse,

J. TROISIER.

Vu : le Doyen,

A. BAUDOUIN.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Gilbert GIDEL.

BIBLIOGRAPHIE

- BORDET (J.). — La fixation de l'alexine et sa signification pour l'immunité. *Ztschr. f. Immunf., Ref.*, 1909, t. 1, 2^e partie, p. 1.
- BRAND (E.). — Ueber das Verhalten der Komplemente bei der Dialyse. *Berl. kl. Wschr.*, 1907, p. 1075.
- BOYD (W.). — On the mechanism of specific precipitation. *J. of. exp. Med.*, 1942, t. 75, p. 407.
- BUCHNER (H.). — Weitere Untersuchungen ueber die bakterienfeindlichen und globuliciden Wirkungen des Blutserums. *Arch. f. Hyg.*, 1893, t. 17, p. 112 et 179.
- COCOA (A.). — A study of the anticomplementary action of yeast, of certain bacteria and of cobra-venom. *Ztschr. f. Immunf.*, 1914, t. 21, p. 604.
- DA COSTA CRUZ et DE AZEVEDO PENNA (H.). — Constituição de alexina e mecanismo de hemolyse especifica. *Memorias de Instituto Oswaldo Cruz*, 1932, t. 26, fasc. 2, p. 99.
- EHRlich (P.) et MORGENROTH (J.). — Ueber Hämolysine. *Berl. kl. Wschr.*, 1900, p. 453 ; 1899, p. 6.
- FERRATA (A.). — Die Unwirksamkeit der komplexen Hämolysine in salzfreien Lösungen und ihre Ursache. *Berl. kl. Wschr.*, 1907, p. 366.
- FRIESE (V.) et SILBER (L.). — Untersuchungen ueber individuelle Eigenschaften des Komplements. *Ztschr. f. Immunf.*, 1924, t. 40, p. 383-392.

- GENGOU (O.). — Notes sur les relations de l'alexine avec les microbes sensibilisés. *Ztschr. f. Immunf.*, 1911, t. 11, p. 143-148.
- GORDON (J.), WHITEHEAD (H. R.) et WORMALL (A.). — a) The third component or heatstable factor of complement ; b) The action of ammonia on complement. The fourth component ; c) Calcium and complement action ; d) The fourth component of complement and its relation to opsonin. *Bioch. J.*, 1925, t. 19, p. 618-625 ; 1926, t. 20, p. 1028, 1035, 1036, 1043, 1044, 1045.
- HEIDELBERGER (M.). — Quantitative chemical studies on complement or alexin. *J. of exp. Med.*, 1943, t. 73, p. 681-694.
- KOSSOVITCH (N.), ILINE (V.), COULON (G.). — a) Mécanisme de l'hémolyse spécifique et rôle des différentes fractions du complément. *Soc. Biol. Comptes rendus*, 1944, t. 137, p. 170, 171 ; b) Quelques considérations sur la réaction de congutination. *Soc. Biol. Comptes rendus*, 1944, t. 138, p. 272, 273.
- LIEFMANN (H.) et COHN (M.). — Die Wirkung des Komplementes auf die ambozeptorbeladenen Blutkörperchen. *Ztschr. f. Immunf.*, 1910, t. 7, p. 669-692.
- MAIGNON (F.), THIERY (J. P.) et MÉRAT (J.). — Origine et nature de l'alexine sanguine. *C. R. Soc. Biol.*, 1942, t. 136, p. 718, 719.
- MICHAELIS (L.) et SWIRSKY (P.). — Die Emfindlichkeit des Komplementes gegen Fermente. *Ztschr. f. Immunf.*, 1910, t. 7, p. 497-506.
- NATOLI (A.). — Sulla azione anticomplementare del siero umano normale. *Bol. dell Ist. Sieroter. Milanese*, 1938, t. 18, p. 610.
- NATTAN-LARRIER (L.) et STEEG (L.) et DUFOUR (Mlle). — Les caractères du pouvoir anticomplémentaire. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, t. 128, p. 1031. Le choix de la température d'inactivation des sérums. *Ibid.*, p. 1044.

NOLF (P.). — De l'origine du complément hémolytique et de la nature de l'hémolyse par les sérums. *Bull. Acad. Sci. Belgique*, 1908, p. 748.

— Le mécanisme de la globulyse. *Ann. Inst. Pasteur*, 1900, t. 14, p. 656.

PILLEMER (L.), SEIFERT (J.) et ECKER (E.). — The effect of amino compounds on the fourth component of complement. *J. of Immunol.*, 1941, t. 40, p. 89-95.

PILLEMER (L.), ECKER (E.). — The effects of acids and alcalis on the fourth component of complement and the role of calcium. *J. of Immunol.*, 1941, t. 40, p. 101-106.

PILLEMER (L.), ECKER (E.), ONCLEY (J. L.) et COHN (E.). — The preparation and physico-chemical characterization of the serum protein components of complement. *J. of exp. Med.*, 1941, t. 74, p. 297-308.

PILLEMER (L.), SEIFTER (S.) et ECKER (E.). — The role of the components of complement in specific immune fixation. *J. of exp. Med.*, 1942, t. 75, p. 421-435.

PILLEMER (L.). — Voir aussi : *J. of exp. Med.*, 1941, t. 74, p. 297.

PILLEMER (L.), SEIFTER (S.), CHU FEY et ECKER (E.). — Function of components of complement in immune hemolysis. *J. of exp. Med.*, 1942, p. 76, p. 93-101.

ECKER (E.), PILLEMER (L.) et KUEHN (A.). — Thermostability of heat-stabile components of complement. *Proc. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1940, t. 45, p. 115-116.

PONS (R.). — Action du formol sur les antigènes et les anticorps. *Rev. d'Immunol.*, 1942, t. 7, p. 222-230.

SACHS (H.). — Experimentelle spezifische Diagnostik mittels Agglutination, Baktericidie (Lyse) und Komplementbindung. *Hb. der path. Mikroorg.*, 3^e édit., 1928, t. 3, p. 203.

— Serologische Kolloidstruktur, Komplementwirkung und Kältehämolysse. *Ztschr. f. Immunf.*, 1937, t. 91, p. 328.

SCARTOZZI (C.). — Del potere complementare. *Giorn. Batt. e Immunol.*, 1937, t. 18, p. 721, 746, 786; 1937, t. 19, p. 797.

— Pouvoir complémentaire faible à caractère familial (Communication au VI^e Congrès de Microb. de Milan).

SHERWOOD (N. P.). — Immunology, 1 vol. London, 1935, p. 359.

TODA (T.) et MITSUSE (B.). — Studien über die Komponenten des hämolytischen Komplements. *Ztschr. f. Immunf.*, 1938, t. 78, p. 62-81.

TOPLEY (W. W. C.) et WILSON (G. S.). — The principles of Bacteriology and Immunity. 1 vol. London, p. 135.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
I. — Introduction.....	11
II. — Généralités. Historique	14
III. — Constitution complexe du complément.....	23
A. Fractions thermolabiles du complément, fraction globulinique (C'_1) et albuminique (C'_2)	24
a) Partie théorique.....	24
b) Partie pratique.....	28
B. Fractions thermorésistantes (C'_3 , C'_4 , C'_5)	30
1. Troisième fraction (C'_3).	
c) Partie théorique.....	30
d) Partie pratique.....	32
2. Quatrième fraction (C'_4).	
e) Partie théorique	41
f) Partie pratique.....	42
3. Cinquième fraction (C'_5).	
g) Partie théorique.....	46
h) Partie pratique	47
IV — Sur quelle partie du sérum sont fixées les diverses fractions du complément.....	50
V. — Action de la chaleur sur les différentes fractions du complément (amplitude thermique).....	55
VI. — Ordre dans lequel sont adsorbées les diverses fractions du complément.....	58
VII. — Conclusions générales.....	63
Bibliographie	66